

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EM RATOS *WISTAR* DESCENDENTES DE MÃES OBESAS

Sandriele Oliveira Pádua¹
Shayenne Kattucya Fonseca Silva²
Crisley Sharon Gomes Assis³
Monatha Nayara Guimarães Teófilo⁴
Frank Sousa Castro⁵
Laiza Alencar Santos Barros⁶
Karlla Greick Batista Dias Penna⁷
Graziela Torres Blanch⁸
Clayson Moura Gomes⁹

PÁDUA, S. O.; SILVA, S. K. F.; ASSIS, C. S.; TEÓFILO, M. N. G.; CASTRO, F. S.; BARROS, L. A. S.; PENNA, K. G. B. D.; BLANCH, G. T.; GOMES, C. M. Avaliação dos parâmetros hematológicos em Ratos *Wistar* descendentes de Mães obesas. *Arq. Cienc. Saúde UNIPAR*, Umuarama, v. 24, n. 1, p. 27-34, jan./abr. 2020.

RESUMO: O modelo de obesidade em ratos por meio de uma dieta hiperlipídica têm se consolidado, sendo relevante compreender os componentes da hereditariedade nesta enfermidade. Por meio do hemograma é possível avaliar os elementos sanguíneos e as células responsáveis pela defesa do organismo, incluindo sua morfologia, bem como interpretando-as. Compreender esses fatores em ratos descendentes de mães obesas poderia contribuir na compreensão dos mecanismos imuno-hematológicos envolvidos na obesidade e na hereditariedade. Com isso, o objetivo deste estudo é avaliar os parâmetros hematológicos e leucocitários de ratos alimentados com dieta hiperlipídica descendentes de mães obesas. Foram utilizadas 20 ratas *Wistar* (peso inicial 200g) alimentadas com dieta padrão (CT) ou com dieta hiperlipídica (HL). Posteriormente, alocou-se 3 fêmeas com 1 macho por 4 dias, certificando o cruzamento. Após 23 dias do nascimento da ninhada, foi feita a separação da prole em 4 grupos com 5 animais cada, e submetidos à dieta HL ou CT. Ficando então os grupos CT, CT+ HL, HL, HL + CT. Após 20 semanas de dieta, os animais foram anestesiados e tiveram peritônio exposto para coleta de sangue, que serviu para a realização e análise do hemograma, por diferenciação celular. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes da utilização de animais para fins científicos (Lei 11.794/08), e protocolada no CEUA sob o nº 9062310117. As ratas HL tiveram um ganho de peso significativamente maior a partir da 10ª semana, comparando as ratas CT. Já em relação à prole, após 13 semanas, o grupo HL obteve um ganho de peso maior em relação aos demais grupos: CT: $144,8 \pm 12,15$ g; CT+HL (ratos descendentes de mães CT alimentados com ração HL): $138,6 \pm 5,34$ g; HL+CT (ratos descendentes de mães HL alimentados com ração CT): $152,2 \pm 5,23$ g; HL 161 $\pm 10,75$ g. Nos parâmetros hematológicos da prole, foi observada diferença entre o grupo CT e experimental, os monócitos apresentaram uma redução significativa de $1,6 \pm 0,89$, hemoglobina $13,8 \pm 1,07$, hematócrito $37,9 \pm 5,51$ nos grupos que receberam dieta CT comparado à CT+HL, VCM apresentou aumento de $50,4 \pm 0,55$ no grupo CT e $53,5 \pm 0,58$ na dieta HL. Dentro das condições experimentais deste trabalho e com base nos resultados obtidos, conclui-se que a dieta hiperlipídica é capaz de induzir a obesidade, com capacidade de influenciar a proliferação e a diferenciação hematopoética, porém a prole alimentada com ração padrão (CT) consegue adaptar a dieta independente do fator hereditário em relação à obesidade.

PALAVRAS-CHAVE: Obesidade. Dieta hiperlipídica. Hemograma. Leucograma. Ganho de peso.

EVALUATION OF HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN WISTAR RATS DESCENDING FROM OBESE MOTHERS

ABSTRACT: The obesity model in rats maintained by a hyper-lipidic diet is well known, and thus, there is a need to understand the components of heredity in this disease. Using HEM, it is possible to study the blood elements and cells involved in the defense of the organism, including cell morphology and its interpretation. Understanding these factors in rats descending from obese mothers may contribute to the comprehension of the immunity and hematologic mechanisms involved in both obesity and heredity. The purpose of this study is to evaluate the hematologic and leukocyte parameters of rats fed with a hyper-lipidic diet descending from obese mothers. A total of twenty *Wistar* female rats (initial weight 200g) fed standard diet (SD) or hyperlipidic diet (HD) were used. Subsequently, 3 females were housed with a male for 4 days in order to get inseminated. Twenty-three days after born, the animals were separated into 4 groups, with 5 animals in each group. The groups were organized as follows: SD, SD+HD, HD, SD+HD. The animals were kept on a diet for 20 weeks. In the end of that period, animals were anesthetized and had their peritoneum exposed for the collection of blood, which was used for performing the erythrogram and leukogram analysis via cellular differentiation. All procedures were performed according the animal welfare guidelines (Law No. 11.794/08) and approved by CEUA (number 9062310117). After 10 weeks, HL mothers presented an increased body weight when compared with SD mothers. In relation to the offspring, after 13 weeks, the HD group presented greater weight gain when compared to the other groups, as follows: SD: 144.8 ± 12.15 g; SD+HD (rats from SD mothers fed with HD feed): 138.6 ± 5.34 g; HD + SD (offspring from HL mothers fed with SD feed): 152.2 ± 5.23 g; HD 161 ± 10.75 g. The offspring hematological parameters presented differences between the SD and the experimental group, where the monocytes presented a significant reduction (1.6 ± 0.89),

DOI: 10.25110/arqsaude.v24i1.2020.7419

¹Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas sandriele.padua@gmail.com

²Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas shayenne.kattucya@gmail.com

³Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas crisleyassis@gmail.com

⁴Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas monathateofilo@gmail.com

⁵Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas knarfcastro@gmail.com

⁶Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas barros.laiza@gmail.com

⁷Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas karllagreick@gmail.com

⁸Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas grazzielatb@gmail.com

⁹Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas claysonmoura@yahoo.com.br

hemoglobina (13.8 ± 1.07), hematócrito (37.9 ± 5.51) in the groups that received a SD diet compared with the SD + HD; the MCV presented an increase of 50.4 ± 0.55 in the SD group and 53.5 ± 0.58 in the group on HD diet. **Conclusion:** Based on the results, it can be concluded that a hyper-lipidic diet is capable of inducing obesity and may also influence hematopoietic proliferation and differentiation. However, the offspring fed with standard diet (SD) is able to adapt the diet regardless of the hereditary factor in relation to obesity.

KEYWORDS: Obesity. Hyper-lipidic diet. Hemogram. Leukogram. Weight gain.

Introdução

A obesidade tem sido considerada uma epidemia mundial (NG *et al.*, 2015), e independente das questões raciais ou sociais é cada vez mais significativo o crescimento dessas taxas nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (PINHEIRO; FREITAS, 2004; SCHWARTZ *et al.*, 2017). É uma doença multifatorial caracterizada pelo excesso de gordura corporal decorrente da hipertrofia dos adipócitos (LEITE; ROCHA; NETO, 2009), no qual envolve em sua gênese aspectos ambientais e genéticos (PINHEIRO; FREITAS, 2004). O aumento da obesidade ao longo do tempo pode ser justificado pela transição nos padrões nutricionais, por meio das mudanças de caráter epidemiológico, socioeconômico e demográfico, tornando um problema de saúde pública e prejudicando a qualidade de vida dos indivíduos (FRANCISCHI, PEREIRA, 2001).

A importância genética na etiologia da obesidade também tem sido foco de pesquisas (KEELE; GREGORY, 2017; RANKINEN *et al.*, 2002), onde foram relacionados os hábitos alimentares, estilo de vida, fatores sociológicos, alterações metabólicas, neuro-endócrinas, distúrbios inflamatórios e/ou vasculares bem como os componentes hereditários (CORBALAN *et al.*, 2002). Os fatores genéticos podem responder por 24% a 40% das alterações de massa corporal e de variância do ganho de peso, determinando diferenças em fatores como taxa de metabolismo basal, saciedade e apetite, dentre outros. Acredita-se que as mudanças no padrão de estilo alimentar e sedentarismo atuam sobre os genes de susceptibilidade são os principais determinantes do crescimento da obesidade mundial.

Estima-se que entre 40% e 70% da variação no fenótipo associado à obesidade tem um caráter hereditário. A influência genética como causa de obesidade pode manifestar-se por meio de alterações no apetite e/ou no gasto energético. Assim, os genes, como: *FTO*, *APOA5*, *PPAR*, *ADIPOQ*, *ADRB3*, *MC4R*, e o receptor de Leptina (Lp), intervêm na manutenção de peso e gordura corporal ao decorrer do tempo. Esse controle se dá através da sua atividade no controle de vias aferentes (insulina, catecolaminas, Sistema Nervoso Autônomo (SNA), de mecanismos centrais (neurotransmissores hipotalâmicos) e de vias eferentes (Lp, nutrientes, sinais nervosos, entre outros), assim, o balanço energético, que atua na energia ingerida e gasta, depende cerca de 40% da herança genética, podendo influenciar ambas as partes da equação energética (apetite e gasto) (MARQUES-LOPES, MARTI; MORENO-ALIAGA, 2004; MONTEIRO *et al.*, 1995).

Com a crescente incidência nos casos de obesidade, tornou-se imperativo que modelos animais que compartilhem características da obesidade humana e suas co-morbidades sejam desenvolvidos na busca por novas práticas preventivas ou de tratamentos. A gênese da obesidade em animais parece estar relacionada à modificações genéticas que podem modificar ou suprimir a secreção de neuropeptídeos, hormô-

nios associados com saciedade ou metabolismo. Além disso, conforme o gene modificado, os animais desenvolvem a obesidade precoce ou tardia, em conjunto com outras doenças associadas como resistência à insulina, DM II, hipercolesterolemia, hipertensão arterial e infertilidade, possibilitando a investigação da fisiopatologia da obesidade e das suas comorbidades (KAIYALA; SCHWARTZ, 2011; NELSON; GUYER, 2011).

Os modelos animais de obesidade baseados na modificação de genes estão muito distantes da gênese da obesidade em humanos, sendo que são raros os casos de indivíduos obesos com alguma mutação genética. A secreção de Lp, hormônio secretado pelos adipócitos, é um bom exemplo da diferença entre a gênese da obesidade em animais e em humanos, esse hormônio está relacionado com a redução do apetite que ocorre por meio da inibição da formação de neuropeptídeos relacionados ao apetite (AKYOL, 2009; NASCIMENTO, 2008).

Modelos animais utilizando ratos, são induzidos a um processo de ganho de peso, podendo ser divididos em categorias diferentes, sendo principalmente baseadas em mutações ou manipulações de um ou alguns genes individuais *versus* aqueles em animais geneticamente intactos expostos a ambientes obesigênicos, como aqueles que são mantidos em dietas ricas em gordura (AKYOL; LANGLEY-EVANS; MCMULLEN, 2009; NELSON; GUYER, 2011).

A idade do animal no início do protocolo experimental pode trazer interferência no ganho de massa corporal. Animais jovens têm o metabolismo diferente que proporciona maior ganho de massa magra, por isso é aconselhável que animais mais velhos, com aproximadamente 100 dias, sejam submetidos à indução da obesidade por dieta (TSCHÖP, 2001).

Os animais da linhagem *Wistar* são utilizados em estudos da obesidade induzida por dietas, e os resultados mostram que o peso corporal aumenta. Esses ratos tratados com a dieta hipercalórica e hiperlipídica durante três meses, aumentaram aproximadamente 1,4 vez da massa corporal quando comparados com animais-controle (DA SILVA *et al.*, 2010; LUTZ; WOODS, 2012).

O modelo de indução da obesidade por dieta, na linhagem de ratos *Wistar*, também tem sido utilizado para investigar disfunções endoteliais, sendo que na maioria dos estudos, os animais submetidos a esse tratamento apresentam importantes alterações metabólicas como aumento dos triglicerídeos, que estão relacionados com aumento na produção dos ânions superóxido e consequente diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico, um importante vaso dilatador liberado pelo endotélio vascular (NASCIMENTO *et al.*, 2008; WANG, 2012; ZICCARDI *et al.*, 2002).

A área de hematologia clínica tem contribuído positivamente para a realização de estudos sobre a saúde dos animais (PANAME, 1997) por meio de análises entre as células vermelhas e brancas do sangue, as alterações metabólicas e o estado nutricional com e sem excesso de peso e gordura

corporal. O eritrograma tem objetivo de avaliar quantitativamente e qualitativamente os elementos celulares sanguíneos (hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW) e plaquetas) sendo essencial para a avaliação da saúde atuando como coadjuvante para o diagnóstico de doenças infecciosas, crônicas e entre outros distúrbios (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

Para realização do hemograma é necessário o uso de anticoagulante de maneira correta, pois o uso inadequado pode danificar a amostra (GONZÁLEZ; SILVA, 2006). O EDTA (do inglês *Ethylene diamine tetraacetic acid*) ou ácido etilenodiamino tetra-acético é o anticoagulante mais utilizado para realização de hemograma em espécies domésticas, pois evita a coagulação e preserva as características celulares, enquanto a heparina pode causar alterações morfológicas nos leucócitos e é menos eficiente para impedir a agregação plaquetária (BEZERRA *et al.*, 2013).

Já o leucograma é um exame complementar de diagnóstico, nele é possível fazer a análise das células responsáveis pela defesa do organismo, assim como a capacidade de respostas das mesmas. Este exame é composto pela contagem total de leucócitos (CTL) e contagem diferencial de leucócitos (CDL), incluindo interpretação e morfologia dos glóbulos brancos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos). A contagem diferencial de cada leucócito é emitida em porcentagem (%) na contagem relativa e número de leucócitos/mm³, na contagem absoluta, e pela avaliação da morfologia das mesmas no esfregaço sanguíneo (DESCAT, 2002).

Estas subpopulações leucocitárias que estão relacionadas ao quadro de obesidade, são os neutrófilos e eosinófilos (CHMELAR; CHUNG, 2013). Os neutrófilos participam da doença metabólica induzida por inflamação (TALUKDAR *et al.*, 2012). Estudos em camundongos indicaram que esses dois tipos celulares podem promover a resistência à insulina, no entanto, as células do sistema imune adaptativo, especificamente os linfócitos B e T, emergiram como controladores da resistência à insulina e participam da modulação da inflamação do tecido adiposo durante o desenvolvimento da obesidade (BALLAK *et al.*, 2011).

Citocinas inflamatórias, que são produzidas pelo tecido adiposo na obesidade como a interleucina 6 (IL-6), estão conectadas à anemia (BASTARD *et al.*, 2006; MCCLUNG, 2009). A IL-6 estimula a produção da proteína hepcidina, que inibe a liberação de ferro para o plasma a partir da internalização e degradação da ferroportina que está presente na membrana das células, resultando em uma anemia por deficiência de ferro, normalmente conhecida como anemia da doença crônica (NEMETH, 2006; FLEMING, 2008). O TNF é uma citocina pró-inflamatória que age diretamente no adipócito atuando no acúmulo de gordura e interferindo diretamente em diversos processos dependentes de insulina, como a homeostase glicêmica e o metabolismo de lipídios (SETHI, 1999).

A adoção de dietas hipercalóricas e/ou hiperlipídicas tem sido utilizada como um modelo de indução de obesidade em animais de laboratório. Este modelo é extremamente útil nas pesquisas com obesidade devido a sua grande semelhan-

ça com a gênese e com as respostas metabólicas decorrentes da obesidade em humanos (THOMAS; WOODS, 2012).

A grande similaridade e homologia entre os genomas de seres humanos e roedores tornam os modelos animais uma grande ferramenta para compreender as condições que afetam os seres humanos, pelo qual podem ser simuladas em ratos. A administração de dieta hipercalórica é o modelo mais simples para indução da obesidade e possivelmente um dos que mais se assemelha a realidade da obesidade em seres humanos (DIEMEN *et al.*, 2006).

Os impactos já conhecidos da obesidade nos diversos sistemas do organismo incentivam a hipótese de que o tratamento com dieta hipercalórica e hiperlipídica a partir do desmame, apresenta consequências negativas para o animal sobre sua defesa contra infecções, mudanças no perfil hematológico e marcadores bioquímicos. Supõe que o consumo prolongado desta dieta traz um aumento do consumo alimentar, ingestão calórica, peso corporal, gordura visceral e níveis circulantes de glicose, colesterol e triglicerídeos (ALVEZ, 2006).

Assim, frente ao que foi apresentado, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações no ganho de peso e nos parâmetros hematológicos em animais mantidos com uma dieta hiperlipídica palatável por um período prolongado, e analisar se os descendentes de mães que também tiveram acesso a essa dieta durante a prenhez, ganharão peso com mais facilidade e serão mais suscetíveis à obesidade.

Materiais e Métodos

Animais

Inicialmente foram utilizadas 20 ratas *Wistar* com peso inicial aproximadamente de 100 gramas, oriundas do Biotério Setorial da Escola de Medicina, Farmácia e Biomedicina da PUC Goiás. Os animais foram mantidos o tempo todo em ambiente controlado com ciclo claro/escuro 12h-12h, água e ração *ad libitum*. Dois tipos de dieta foram utilizados neste experimento:

1. dieta padrão (normolipídica)
2. dieta hiperlipídica, para ganho de peso.

A dieta hiperlipídica consiste em uma mistura de ração padrão, amendoim, biscoito de amido e chocolate ao leite, na proporção 3:2:2:1. A ração, o amendoim e o biscoito são triturados e misturados ao chocolate derretido e quando necessário um pouco de água. A mistura é moldada em formato parecido com a ração padrão e mantido em geladeira (por até duas semanas) até o momento de ser oferecido aos animais.

Os animais permaneceram nesta dieta até atingirem pelo menos 220 gramas (grupo controle), quando foram colocadas para cruzar. Após o período de amamentação as ratas foram eutanasiadas.

Separação dos animais adultos

Foram então alocadas três fêmeas com um macho por 4 dias, para certificar-nos que as ratas tiveram contato com o macho em seu período fértil.

Após esse tempo, as fêmeas foram transferidas para gaiolas individuais e acompanhadas por até 23 dias, tempo em que a ninhada nasceu.

Separação da prole

Após o nascimento da prole, foi feita a sexagem dos animais recém-nascidos sendo selecionados apenas as fêmeas para prosseguimento deste estudo.

Após o desmame (21 dias) eles foram alocados em caixas com até quatro animais e o experimento prosseguiu na 2ª geração. Aos animais mantidos em dieta padrão foi oferecido o alimento industrializado (dieta comercial padrão para pequenos roedores).

Dieta da Prole

Após 21 dias de nascidos e já desmamados começou a dieta para os grupos conforme a Figura 1:

Grupo 1. Controle (CT)

Grupo 2. Controle e Hiperlipídica (CT+HL)

Grupo 3. Hiperlipídica (HL)

Grupo 4. Hiperlipídica e Controle (HL+CT)

Onde foram mantidos nessa dieta por 20 semanas:

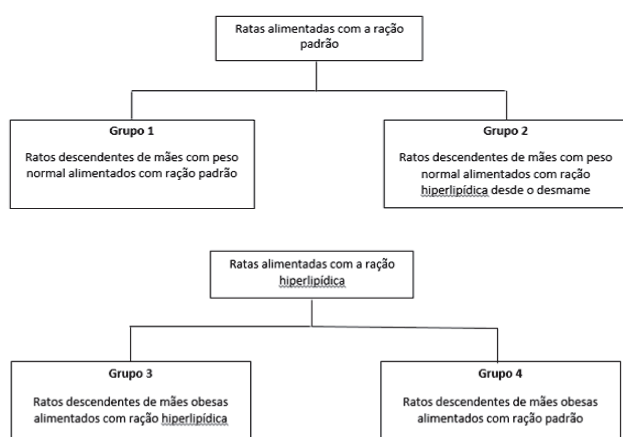


Figura 1: Fluxograma das ratas alimentadas com a ração padrão e hiperlipídica e os respectivos descendentes, separados em 4 grupos.

Obtenção da Amostra

Em relação ao sofrimento imposto aos animais, o mesmo foi minimizado com a utilização de anestésicos e analgésicos. Após 20 semanas de dieta os animais foram humanitariamente eutanasiados por anestesia profunda (pentobarbital, 80 mg/dose única), conforme descrito no protocolo 5 e o peritônio foi exposto para coleta de sangue. Um total de 2 mL de sangue foi coletado para a realização do Hemograma.

A carcaça e todo material biológico não utilizado após os experimentos foram congelados e, subsequentemente, recolhidos por empresa conveniada e incinerados. Todos os procedimentos foram realizados em acordo com as diretrizes e com a regulamentação da utilização de animais para fins científicos (Lei 11.794/08).

Hemograma

As análises hematológicas foram realizadas em amostras de sangue total coletado em tubos contendo solução anticoagulante EDTA (para análise de hemograma), utilizando um analisador automatizado hematológico para os seguintes parâmetros: contagem de células vermelhas do

sangue (RBC), hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de células brancas do sangue (RDW, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos) e plaquetas.

O esfregaço sanguíneo foi realizado a partir de uma gota de sangue, utilizando lâmina. Após realizou-se a coloração das lâminas com corante panótico (azul de metileno e eosina).

Considerações éticas

Todos os procedimentos foram realizados em acordo com as diretrizes e com a regulamentação da utilização de animais para fins científicos (Lei 11.794/08), e protocolada sob o CEUA nº 9062310117.

Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média \pm DP (Desvio Padrão) e analisados através de análise de variância ANOVA de uma via, associadas ao teste de Bonferroni, em ambos os casos assumindo-se $p < 0,05$ como valor significativo. O software utilizado para as análises foi o Graph Prisma (Inc. San Diego, CA, USA), versão 6.

Resultados

Variação de peso das mães

Foi observado no decorrer de 15 semanas o ganho de peso das mães alimentadas com dieta HL as quais obtiveram um aumento de peso significativo, quando comparadas às mães alimentadas com a dieta padrão (CT).

As mães pertencentes aos grupos CT e HL, iniciaram a dieta respectivamente com $116,6 \pm 5,6$ g e $110,4 \pm 5,31$ g. Após 14 semanas o grupo CT apresentou um ganho de peso de $212,6 \pm 12,34$ enquanto o grupo HL $294,6 \pm 9,87$ g. Estes valores permaneceram aumentados até a 15ª semana, a qual as ratas foram colocadas para o cruzamento (FIGURA 2).

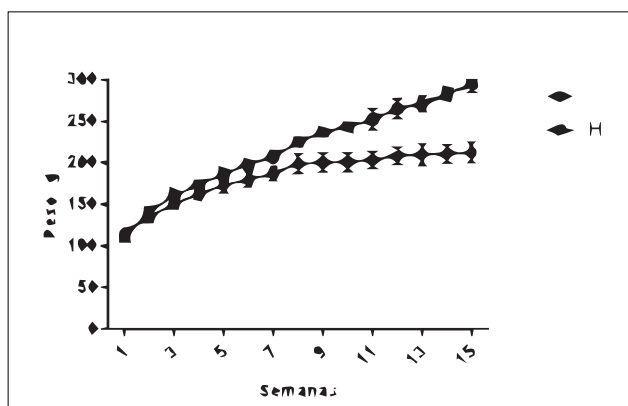


Figura 2: Variação de peso das mães pertencentes ao grupo Controle (CT) e Hiperlipídico (HL) em relação às 15 semanas onde foram submetidas à dieta. Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão indicado por barra ($n=5$ /grupo), e analisados através de análise de variância ANOVA de uma via, associadas ao teste de Bonferroni, em ambos os casos assumindo-se $* p < 0,05$.

Variação de peso da prole

Ao final das 20 semanas, a prole HL obteve um ganho de peso significativamente maior comparado aos demais grupos. O ganho de peso dos animais que receberam a dieta CT foi de $144,8 \pm 12,15$ g, e os com dieta CT+HL: $138,6 \pm 5,34$ g, ambos descendentes de mães controle.

Os que foram submetidos a dieta HL foi de $161 \pm 10,75$ g e HL+CT: $152,2 \pm 5,23$ g, ambos descendentes de mães alimentadas com dieta Hiperlipídica (FIGURA 3).

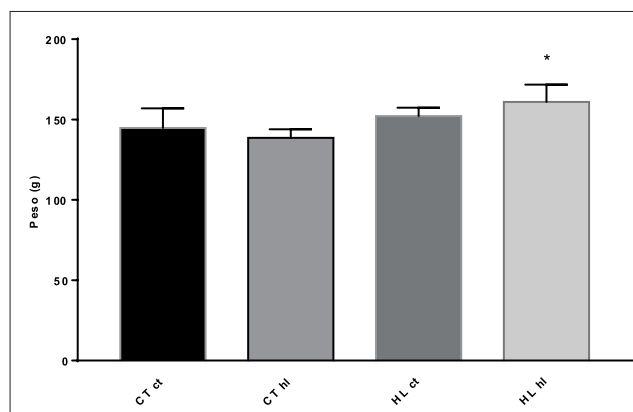


Figura 3: Variação do ganho de peso (g) da prole (n=5/grupo). CT (prole controle alimentada com dieta padrão); grupo CT+HL (prole CT alimentada com dieta hiperlipídica); grupo HL+CT (prole HL alimentada com dieta controle); grupo HL (prole HL alimentada com dieta hiperlipídica). Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão do ganho de peso (g) da prole em seus respectivos grupos indicado por barras averiguadas por meio de análise de variância ANOVA de uma via, associadas ao teste de Bonferroni, em ambos os casos assumindo-se * $p < 0,05$.

Parâmetros Hematológicos da Prole

Após realizar o hemograma foi observado um aumento significativo de $13,8 \pm 1,07$ g/dL em relação a concentração de hemoglobina, e de $37,9 \pm 5,51$ % em relação ao hematócrito nos grupos que receberam dieta padrão (CT) comparado ao grupo CT+ HL (TABELA 1).

Em relação ao parâmetro do Volume corpuscular médio (VCM), observou-se um aumento significativo de $50,4 \pm 0,55$ μm^3 do grupo CT quando comparado aos grupos submetidos a dieta HL ($53,5 \pm 0,58$ μm^3) e dieta HL+CT ($52,80 \pm 1,64$ μm^3) (TABELA 1).

Tabela 1: Parâmetros Hematológicos

Parâmetro	CT	CT+HL	HL+CT	HL
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	$7,52 \pm 1,10$	$7,89 \pm 0,65$	$8,38 \pm 0,24$	$8,08 \pm 0,27$
Hemoglobina (g/dL)	$13,88 \pm 1,07\text{a}$	$14,20 \pm 0,78$	$15,40 \pm 0,66$	$15,15 \pm 0,34$
Hematócrito (%)	$37,94 \pm 5,51\text{a}$	$41,15 \pm 2,06$	$44,18 \pm 2,00$	$43,28 \pm 1,14$
VCM (μm^3)	$50,40 \pm 0,55\text{a,b}$	$52,25 \pm 1,89$	$52,80 \pm 1,64$	$53,50 \pm 0,58$
HCM (pg)	$18,68 \pm 1,92$	$17,98 \pm 0,49$	$18,40 \pm 0,70$	$18,75 \pm 0,26$
CMHC (g/dL)	$36,94 \pm 3,47$	$34,40 \pm 0,62$	$34,82 \pm 0,32$	$35,00 \pm 0,36$
RDW (%)	$12,28 \pm 0,44$	$12,68 \pm 0,48$	$12,18 \pm 0,93$	$12,55 \pm 0,53$
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	$679,60 \pm 76,65$	$434,50 \pm 259,79$	$556,20 \pm 125,78$	$481,00 \pm 286,51$

CT: Grupo Controle CT + HL: Grupo Controle e Hiperlipídico

HL + CT: Grupo Hiperlipídico e Controle

HL: Grupo Hiperlipídico

(a): Diferença significativa ($p < 0,05$). Relação CT e HL+CT

(b): Diferença significativa ($p < 0,05$). Relação CT e HL

VCM: Volume Corpuscular Médio,

HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média,

RDW: Distribuição do Volume Eritrocitário.

Foi observado também o percentual do número de monócitos, no qual verificou que os animais descendentes de mães obesas submetidos à dieta Controle (HL+CT) apresen-

taram uma diminuição significativa de $1,60 \pm 0,89$ quando comparados aos animais do grupo CT (TABELA 2).

Tabela 2: Parâmetros Leucocitários

Parâmetros	CT	CT+HL	HL+CT	HL
Leucócitos($10^3/\text{mm}^3$)	$2,8 \pm 0,63$	$2,13 \pm 0,98$	$2,20 \pm 0,83$	$2,03 \pm 0,79$
Linfócitos (%)	$87,40 \pm 1,52$	$79,75 \pm 24,68$	$88,60 \pm 7,70$	$91,25 \pm 2,75$
Monócitos (%)	$8,00 \pm 1,41a$	$2,00 \pm 1,41$	$1,60 \pm 0,89$	$2,25 \pm 1,26$
Neutrófilos (%)	$3,40 \pm 0,89$	$3,75 \pm 1,70$	$7,80 \pm 6,91$	$4,50 \pm 1,91$
Eosinófilos (%)	$1,20 \pm 0,45$	$2,75 \pm 3,50$	$1,0 \pm 0$	$1,0 \pm 0$
Basófilos (%)	0	$2,75 \pm 3,50$	$1,0 \pm 0$	$1,0 \pm 0$

(a): Diferença significativa ($p < 0,05$) do CT

CT: Grupo Controle

CT + HL: Grupo Controle e Hiperlipídico

HL + CT: Grupo Hiperlipídico e Controle

HL: Grupo Hiperlipídico

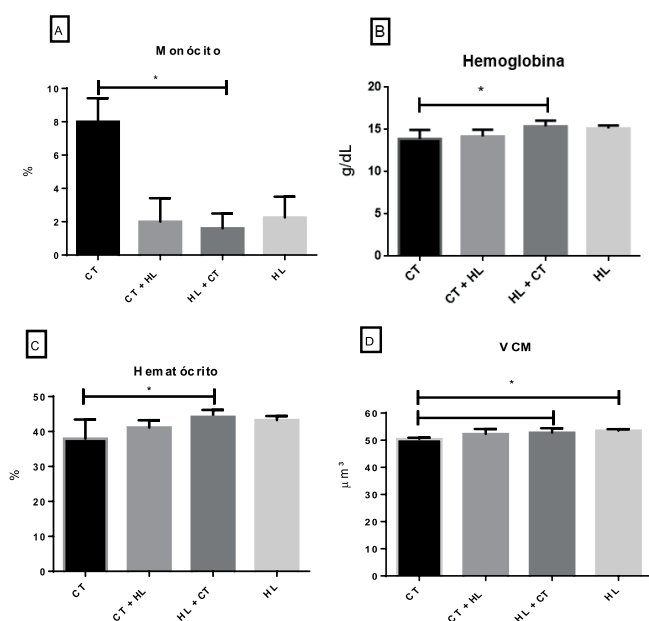


Figura 4: Avaliação dos parâmetros alterados. (A) Monócitos (%), (B) Hemoglobina (g/dL), (C) Hematócrito (%), (D) VCM (μm^3). (n=5/grupo). Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão indicados por barra e analisados por meio de estudo de variância ANOVA de uma via, associadas ao teste de Bonferroni, em ambos os casos assumindo-se * $p < 0,05$.

Discussão

A maioria dos estudos em ratos estão concentrados em modificações na dieta da mãe em curto prazo, durante a gestação e/ou lactação, resultando em graus variados de alterações fenotípicas (ELAHI *et al.*, 2009). Assim, este estudo estendeu o consumo da dieta hiperlipídica para além do período de desmame, a fim de investigar as consequências para os descendentes até que estes se tornem adultos.

No decorrer do experimento, avaliou-se o efeito da dieta hiperlipídica em ratas durante a gestação e lactação, como também na dieta dos seus descendentes. Os dados apresentados demonstram que a dieta materna hipercalórica durante prenhes e lactação influencia no ganho de peso da prole do sexo feminino que também faz uso desta dieta. O mesmo resultado foi observado que existência de relações entre a nutrição materna durante a prenhes e o desenvolvimento de alterações metabólicas na prole descendente, tendo evidências de que a composição corporal materna por si só é

um fator que predispõe à adiposidade nos filhotes (SACKS *et al.*, 2006). Também há um estudo afirmando que a maior adiposidade materna, e não somente o consumo de dieta rica em lipídeos, é necessária para induzir um ganho de peso nos descendentes quando adultos (WHITE; PURPERA; MORRISON, 2009) da mesma forma, neste presente estudo, foi observado na variação do ganho de peso da prole pertencentes ao grupo HL, uma semelhança aos experimentos supra citados.

Em relação aos demais grupos, não foram reveladas diferenças significativas no ganho de peso, corroborando com um estudo que demonstrou que dietas ricas em gordura reduzem a eficiência alimentar e aumentam a eficiência metabólica, o que pode explicar porque a dieta hiperlipídica não apresentou um ganho de peso significativo (ZAMBON *et al.*, 2009).

Nas proles descendentes de mães obesas, e que foram alimentadas com dieta rica em gordura (HL+CT) foi observado uma alteração hematológica significativa demonstrada pela diminuição do número de monócitos quando comparado ao grupo Controle (CT). Podemos correlacionar essa redução com o fato de que em algum momento esses animais, incluindo os demais grupos CT+HL e HL, foram tratados com dieta hiperlipídica a qual possivelmente está induzindo uma diminuição de monócitos. Sabendo que este leucócito faz parte do sistema imunitário e está ligado ao quadro inflamatório, é possível que sejam classificados como anti-inflamatórios.

Os monócitos diferenciam-se em macrófagos após transmigração para o tecido adiposo branco. Essa relação com adipócitos, macrófagos e células endoteliais pode agravar o estado inflamatório local e sistêmico, resultando em uma secreção aumentada de citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias, adipocinas e fatores angiogênicos (WEISBERG *et al.*, 2003).

Algumas quimiocinas são consideradas pró-inflamatórias e sua liberação pode ser induzida durante uma resposta imune em um sítio de infecção, enquanto outras são consideradas homeostáticas e estão envolvidas no controle da migração celular durante o desenvolvimento ou a manutenção dos tecidos. O receptor C de quimiocina 1 (CX3CR1) também conhecido como receptor da fractalcina é um marcador bem estabelecido de monócitos anti-inflamatórios ou circulantes conhecidos por fornecerem sinal pró-sobrevivência para monócitos anti-inflamatórios, mas também está presente em células NK, células T e células musculares lisas, onde medeiam migração, adesão e proliferação (WEISBERG *et*

al., 2003). Contudo, é necessário que seja feito o rastreamento do fenótipo desses monócitos, para saber se realmente são pró ou anti- inflamatórios.

A literatura demonstra que, o aumento do tecido adiposo pode elevar diversos mediadores inflamatórios com capacidade de influenciar a proliferação e a diferenciação hematopoética. Assim, interferir no mecanismo de apoptose (APOSTOLAKIS; SPANDIDOS, 2013) podendo relacionar alterações significativa dos parâmetros hematológicos como: hemoglobina, hematócrito, VCM e monócitos entre a prole descendente de mães CT alimentadas com dieta controle e a prole descendentes de mães HL alimentadas com dieta padrão.

Foram encontradas alterações significativas nos parâmetros de hemoglobina, hematócrito e do VCM nos grupos CT quando comparadas ao grupo HL+CT. Pode-se correlacionar esses dados com o fator da hereditariedade, na qual contribui para o quadro de obesidade para com seus descendentes, alterando estes parâmetros hematológicos. Porém ao comparar com os demais grupos, não se obteve alterações significativas. O mesmo ocorreu no estudo que demonstrou que a dieta hiperlipídica não alterou a série vermelha dos animais e verificou que a taxa de eritrócitos, concentração de hemoglobina e porcentagem de hematócrito do grupo experimental não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparados ao controle (CARMO, 2012). Ainda em relação ao parâmetro VCM, o aumento significativo do grupo CT quando comparado ao grupo submetido a dieta HL poderia estar associado a interferência nutricional, quantidade de ferro e minerais (LIMA *et al.*, 2014).

Os resultados hematológicos de um estudo demonstraram que os valores de referência em ratos *Wistar* foram similares aos humanos, com restrição da quantidade de hemácias e plaquetas, pois os ratos possuem uma maior quantidade dessas células, o que certifica maior viscosidade ao sangue e rápida coagulação (LIMA *et al.*, 2014).

Assim os índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) são calculados a partir das hemácias, hematócrito e hemoglobina, que sofrem também uma pequena alteração quando comparados aos valores de referência, porém, no estudo de CARMO (2012) demonstra que nas fêmeas podem ter variações hormonais que podem alterar a variação de mobilização celular (CARMO, 2012).

Conclusão

Dentro das condições experimentais deste trabalho e com base nos resultados obtidos, conclui-se que a dieta hiperlipídica é capaz de induzir a obesidade, com capacidade de influenciar a proliferação e a diferenciação hematopoética, porém a prole alimentada com ração padrão (CT) consegue se adaptar a dieta independente do fator hereditário em relação à obesidade. Alguns parâmetros do hemograma como hematócrito, hemoglobina, VCM e monócitos demonstraram alterações em ratos descendentes de mães obesas e controle, independente da dieta. Contudo, outras análises bioquímicas são importantes na avaliação desses animais, tais como a dosagem de glicemia, triglicérides, colesterol total, HDL, creatinina, ureia e ferritina.

Referências

- AKYOL, A.; LANGLEY-EVANS, S. C.; MCMULLEN, S. Obesity induced by cafeteria feeding and pregnancy outcome in the rat. **The British journal of nutrition**, v. 102, n. 11, p. 1601-10, 2009.
- ALVEZ, M. N. R. Os efeitos da obesidade na resposta imune Leptina na imunidade. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 21, n. 4, p. 316-9, 2006.
- PINHEIRO, A. R. O.; FREITAS, S. F. T. F. Uma abordagem epidemiológica da obesidade An epidemiological approach to obesity. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 523-533, 2004.
- APOSTOLAKIS, S.; SPANDIDOS, D. Chemokines and atherosclerosis: focus on the CX3CL1 / CX3CR1 pathway. **Nature Publishing Group**, v. 34, n. 10, p. 1251-1256, 2013.
- BALLAK, D. B. *et al.* Combined B- and T-cell deficiency does not protect against obesity-induced glucose intolerance and inflammation. **Cytokine**, v. 62, p. 96-103, 2013.
- BASTARD, J. P. *et al.* Recent advances in the relationship between obesity , inflammation , and insulin resistance. **Eur Cytokine Netw**, v. 17, n. 1, p. 4-12, 2006.
- BEZERRA, S. *et al.* **Análise Comparativa De Hemogramas De Ratas Submetidos Aos Anticoagulantes Edta (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) E Heparina.** XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, Recife, Brasil. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, p. 3., 2013.
- CARMO, L. S. **Proliferação e diferenciação *in vitro* de células mononucleares medulares após estímulo com fatores de crescimento em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica.** 114f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2012.
- CHMELAR, J.; CHUNG, K. J. C. T. The role of innate immune cells in obese adipose tissue inflammation and development of insulin resistance. **Thromb Haemost.**, v. 109(3), p. 399-406, 2013.
- CORBALAN, M. S. *et al.* Beta(2)-Adrenergic receptor mutation and abdominal obesity risk: effect modification by gender and HDL-cholesterol. **Eur J Nutr**, v. 114-8, 2002.
- DA SILVA, A. S. *et al.* Exercise intensity, inflammatory signaling, and insulin resistance in obese rats. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 42(12), p. 2180-8, 2010.
- DESCAT, F. Hematologie du rat: hemogramme et myelogramme. **Ecole Veterinaire**, p. 105, 2002.
- DIEMEN, V. V. *et al.* Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cir. Bras**, v. 21, n. 6, p. 425-429, 2006.
- ELAHI, M. M. *et al.* Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension , raised plasma lipids and fatty liver

- in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 514-519, 2009.
- FRANCISCHI, R. P.; PEREIRA, L. O. L. J. A. Exercício, comportamento alimentar e obesidade: revisão dos efeitos sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos. **Rev Paul Educ Fis**, v. 15, p. 117-40., 2001.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2. ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2006, p. 357.
- KAIYALA, K. J.; SCHWARTZ, M. W. Toward a more complete (and less controversial) understanding of energy expenditure and its role in obesity pathogenesis. **Diabetes**, v. 60, n. 1, p. 17-23, 2011.
- KEELE, G. R. *et al.* Genetic Fine-Mapping and Identification of Candidate Genes and Variants for Adiposity Traits in Outbred Rats. **The Obesity Society**, v. 26, (1), p. 213-226, 2017.
- LEITE, L.; ROCHA, É.; NETO, J. Obesidade: uma doença inflamatória Obesity: an inflammatory disease. **Revista Ciência & Saúde**, v. 2, p. 85-95, 2009.
- LIMA, C. M. *et al.* Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Sci. Plena**, v. 10, p. 1-9, 2014.
- LUTZ, T. A.; WOODS, S. C. Overview of Animal Models of Obesity. **Curr Protoc Pharmacol**, p. 1-20, 2012.
- MARQUES-LOPES, I.; MARTI, A.; MORENO-ALIAGA M. J. M. A. Aspectos genéticos da obesidade. **Rev Nutr.**, v. 17(3), p. 327-38, 2004.
- MCCLUNG, J. P. K. J. Iron deficiency and obesity: the contribution of inflammation and diminished iron absorption. **Nutr Rev.**, v. 67(2), p. 100-4, 2009.
- MIYAZAKI, T. K. J. A. AIMing at metabolic syndrome. -Towards the development of novel therapies for metabolic diseases via apoptosis inhibitor of macrophage (AIM). **Circ J.**, v. 75, p. 2522-31, 2011.
- MONTEIRO, C. A. *et al.* **Da desnutrição para a obesidade: a transição nutricional no Brasil. Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças**. p. 247-255, 1995.
- NASCIMENTO, A. F. *et al.* A Hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in wistar rats. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 968-974, 2008.
- NELSON, E. E.; GUYER, A. E. The development of the ventral prefrontal cortex and social flexibility. **Dev Cogn Neurosci.**, v. 1, n. 3, p. 233-245, 2011.
- NEMETH E, G. T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. **Annu Rev Nutr.**, v. 26, p. 323-42, 2006.
- NG, M. *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766-781, 2015.
- PANAME, J. A. Estudo Comparativo Entre O Hemograma Humano E Veterinário Resumo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 4, p. 217-231, 1997.
- RANKINEN, T. *et al.* The Human Obesity Gene Map: The 2001 Update. **Obes Res**, v. 10, n. 3, 2002.
- ROBERT E. FLEMING. Iron and inflammation: cross-talk between pathways regulating hepcidin. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, n. 5, p. 491-494, 2008.
- SACKS, D. A. *et al.* What proportion of birth weight is attributable to maternal glucose among infants of diabetic women? **Gynecol., Am J Obstet**, v. 194(2), p. 501-7, 2006.
- SCHWARTZ, M. W. *et al.* Obesity Pathogenesis: An Endocrine Society Scientific Statement. **Endocr Rev.**, v. 38, n. 4, p. 267-296, 2017.
- SETHI, J. K. *et al.* The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. **Semin Cell Dev Biol**, v. 10, n. 1, p. 19-29, 1999.
- TALUKDAR, S. *et al.* Neutrophils mediate insulin resistance in high fat diet fed mice via secreted elastase. **Nat Med**, v. 18, n. 9, p. 1407-1412, 2012.
- TSCHÖP M, H. M. Rodent obesity models: an overview. **Exp Clin Endocrinol Diabetes.**, v. 109(6), p. 307-19, 2001.
- WANG, C. Y. L. J. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. **Methods Mol Biol.**, v. 821, p. 421-33, 2012.
- WEISBERG, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation adipose tissue. **J Clin Invest.**, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.
- WHITE, C. L.; PURPERA, M. N.; MORRISON, C. D. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 296, n. 5, p. 1464-1472, 2009.
- ZAMBON, L. *et al.* Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos Effects of two different types of swimming. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 5, p. 707-715, 2009.
- ZICCARDI, P. *et al.* Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. **Circulation.**, v. 19, p. 105(7): 804-9, 2002.

Recebido em: 13-03-2019
Aceito em: 27-02-2020